

代謝拮抗剤6-チオグアニンの併用療法の開発並びに その相乗効果発現機序に関する研究

著者	藤本 修一
号	195
発行年	1980
URL	http://hdl.handle.net/10097/15240

氏 名 (本籍) ふじ もと しゅう いち
藤 本 修 一

学 位 の 種 類 薬 学 博 士

学 位 記 番 号 薬 第 195 号

学位授与年月日 昭和55年12月10日

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

学 位 論 文 題 目 代謝拮抗剤6-チオグアニンの併用療法の
開発並びにその相乗効果発現機序に関する
研究

(主 査)

論文審査委員 教授 橋 本 嘉 幸 教授 鶴 藤 丞

教授 南 原 利 夫

論文内容要旨

I 緒 言

癌細胞に特異的な選択毒性を示す新抗癌剤が未だ発見されていない現状では、既存薬剤の効率的な利用方法を考案する事が、癌化学療法の発展のために重要な課題となる。その効率的な使用方法の一つが多剤併用療法であり、薬剤単独治療に比し優れた治療成績が認められている。一方、今一つの可能性として、既存薬剤の“再評価”が重要であると痛感された。Wasserman らの報告によれば、代表的な30種の抗癌剤のうち、17種の固型癌に対し臨床的に有効あるいは無効と明らかにされたものが驚く程少なく、大部分の薬剤が“効果未定”であった。著者は、この“薬剤の再評価”の必要性を立証する目的で、対象薬剤に6-thioguanineを選び本研究を行なった。本薬剤は、従来、抗白血病剤として評価されてきたが、最近になって固型癌にも有効性を示す可能性が示唆され注目されている薬剤である。上述した如く、現在、癌の化学療法では多剤併用療法が広く行なわれ、優れた成績が得られているため、本研究に於いても本薬剤を含む治療効果の高い併用療法を開発し、その臨床適応の拡大の可能性を明示する事により、本薬剤の有用性を再評価する事にした。また、上述の如くして開発された併用療法に於ける相乗効果発現の機序を解明し、この併用療法に理論的根拠を与える事も本研究の目的とした。

II マウス実験腫瘍を用いての6-thioguanineを含む併用療法の開発並びにその抗腫瘍効果

臨床効果の予言性が高いとの評価を得て、現在も抗癌剤のスクリーニングシステム及び人白血病の実験モデルとして用いられているL1210白血病を用いて、現在臨床的に使用されている主要な抗癌剤と本薬剤との併用効果に関して数組の実験を行なった。その結果、本薬剤はアルキル化剤との併用、特に我が国で開発された水溶性のニトロソ尿素系抗癌剤であるACNUとの併用で、移植初期のL1210白血病に対しほぼ完全な抗腫瘍効果を示し、全例に近い担癌マウスに60日以上の上の長期生存がみられた。また、この併用療法は限局型の白血病(ip-ip)だけではなく、全身型の白血病(iv-iv, iv-ip)に対しても著効を示した。更にこの併用療法は、頻用されるマウス固型腫瘍であるLewis肺癌およびB16メラノーマに対しても著しい抗腫瘍効果を発揮し、多数の長期生存マウスが認められた。また、その抗腫瘍効果は、各薬剤単独で認められる効果よりも遙かに高いため、相乗効果によるものと判定された。

一方、ACNUとの併用効果に関し、本薬剤と、人癌に対して臨床効果の確立している代表的な代謝拮抗剤である5-fluorouracil および methotrexate との比較実験を行なったところ、ACNUは6-thioguanineとの併用で、難治性の腫瘍系であるLewis肺癌、B16メラノーマ、及び末期

L1210 白血病に対し、最も高い抗腫瘍効果並びに最も広い抗腫瘍スペクトルを示した。更にこの併用療法は、移植初期の固型腫瘍に対してのみならず、移植後7日目の advanced Lewis肺癌に対しても、最大の腫瘍縮小効果および最高の延命効果を示す事が明らかとなった。

Ⅱ 6-Thioguanine と ACNU の併用療法に於ける相乗的治療効果の発現機序の解析

上述した併用実験で、6-thioguanine を単独投与した場合には、これらの難治性腫瘍に対し有意の抗腫瘍効果は全く認められなかったにも拘らず、6-thioguanine は ACNU との併用で相乗的治療効果を発現させた。従って、この併用療法に於ける相乗効果発現の機序を解明する事は興味のある研究であると共に、この併用療法に理論的根拠を付与する重要な課題であると思われるため、L1210 白血病細胞および宿主である BDF₁ マウスを用いて以下の研究を行なった。まず、この相乗効果が、薬剤併用による腫瘍細胞に対する直接の相乗的殺細胞作用によるものであるかを、初代培養の L1210 白血病細胞を用いて検討した。薬剤濃度は、治療量の薬剤を投与した時にマウス体液中で到達するであろう濃度、即ち、理論的最高濃度 (TMC) を基準にして決定した。また、末期 L1210 白血病に対し認められた相乗効果の発現機序を解析する事を目的としたため、マウス腹腔内移植後6日目の細胞と近似の倍加時間を示す培養条件で検討を行なった。更に、腫瘍細胞の生死の判定は、軟寒天コロニー形成法および再増殖試験の二種の方法を用いて行ない、信頼性を高める様に図った。その結果、Drewinko らの方法に従って、各薬剤単独での生残率の積 (相加効果) を併用群の実測された生残率で除した値を synergism index と定めた場合、6-thioguanine は *in vivo* の時と同様、今回用いた実験条件では強い殺細胞作用を示さなかったにも拘らず、ACNU との併用で濃度依存的に ACNU の殺細胞作用を増強させ、TMC である 26 $\mu\text{g/ml}$ の 6-thioguanine と ACNU (1.5 $\mu\text{g/ml}$) の同時処理で、17 から 147 (中央値 31.5) の synergism index を有する相乗的殺細胞作用がコロニー形成法で認められた。同様に、再増殖試験でも 11 から 457 (中央値 55) の synergism index を有する相乗的殺細胞作用が認められた。一方、末期 L1210 白血病に対し低い抗腫瘍効果しか示さなかった。ACNU と methotrexate の併用では、両測定法で 3.0 以下の synergism index を示したにすぎなかった。更に、ACNU と 6-thioguanine の併用に比べて約 100 倍弱い殺細胞効果しか発現されなかった。

次に、ACNU と 6-thioguanine の併用療法に於ける、L1210 白血病細胞に対する *in vivo* での抗腫瘍作用と *in vitro* での殺細胞作用との間の相関性を検討したところ、*in vivo* で認められた種々の特長、例えば併用効果に及ぼす薬剤の dose-response の影響および薬剤の投与順序の影響が、*in vitro* での殺細胞作用でも同様に明らかに認められた。以上の成績は、*in vivo* に於ける相乗的治療効果と *in vitro* に於ける相乗的殺細胞作用との間に高い相関性がある事を強

く示唆するものと思われた。

一方、宿主動物に対する副作用に関して併用効果を検討した結果、致死毒性を指標とする比較の定量性が高いと云われている検定法で、両薬剤を併用した場合に発現する毒性は相加効果以下である事が判明した。更に、両薬剤の用量制限因子とされている骨髓抑制を、骨髓中の総有核細胞数および末梢白血球数を指標として検討した場合にも、この併用療法に於ける副作用は相加効果またはそれ以下であるという結果が得られた。以上の結果より、ACNUと6-thioguanineの併用による相乗的治療効果の主要な発現機序は、薬剤併用により、腫瘍細胞に対しては相乗的な殺細胞作用を示すが、宿主動物に対しては相加効果またはそれ以下の副作用しか示さないためによるもの、即ち、腫瘍細胞に対する“選択毒性”の増強によるものである事を強く示唆するものと思われる。

Ⅳ 6-Thioguanine と ACNU の併用療法に於ける L 1210 白血病細胞に対する相乗的殺細胞作用の発現機序に関する一考察

In vitro での殺細胞作用に於いても、6-thioguanine 単独では強い殺細胞作用を示さなかったにも拘らず、ACNUとの併用ではACNUの殺細胞作用を増強させ、相乗的殺細胞作用を惹起した。従って、上述した“選択毒性の増強”の機序を解析する目的で、L 1210 白血病細胞に対するこの併用の相乗的殺細胞作用の発現機序の解明を試みた。各種代謝拮抗剤とACNUとの併用効果を、6-thioguanine とACNUとの併用と比較検討した結果、相乗的殺細胞作用が発現するためには、用いられた代謝拮抗剤が単に核酸合成に必要な前駆物質の生合成を阻害する作用を有するだけでは不十分であり、6-thioguanine と同様、核酸そのものの塩基構造に組み込まれて、核酸の構造変化を惹起する作用を有する事が重要である事が強く示唆された。一方、代表的なアルキル化剤である nitrogen mustard 等を用いて L 1210 白血病に対する 6-thioguanine との併用効果を検討したところ、ACNUとは全く異った結果が得られた。この事は、同じアルキル化剤に属しても、ACNUの作用機序は通常のアルキル化剤とは異質のものである事を示唆するものと思われた。

以上の結果より次の様な考察を行なった。ACNUの非酵素的分解により生じる、アルキル化能を有する chloroethyl carbonium ion により、DNA二重らせんの guanine-O⁶ と cytosine-N⁴ との間に細胞死に重要と考えられている cross-linking が生じる。この際、DNA鎖中の guanine が予め 6-thioguanine に置換されている場合には、6-thioguanine-S⁶ のアルキル化剤に対する高い反応性により、より多くの cross-linking が生じるであろう。一方、6-thioguanine の殺細胞作用が、核酸中への、特にDNAへの本薬剤の転入と関連づけうるとするならば、本薬剤が正常細胞に比し腫瘍細胞へより多く選択的に転入している事を示唆する報告が既に

ある。従って、抗癌剤であるACNUそれ自身が有する腫瘍選択性と相まって、ACNUは6-thioguanineとの併用により、腫瘍細胞に対して一層選択的に、その殺菌細胞作用を発現する事が出来るものと推察された。

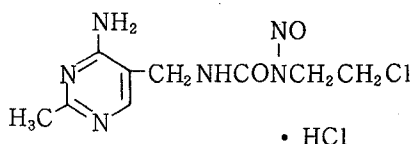
V 結 語

癌の化学療法に於いて、現在使用しうる薬剤の少なさを顧みる時、より選択毒性の高い新抗癌剤を探究する努力は増々払われなければならないが、同時に、我々が現在所有している数少ない貴重な薬剤に対し、改めて慎重な注意が払われる必要があると思われる。ACNUは近年我が国で合成開発された薬剤であり、その臨床治験の歴史は浅いが、既に種々の人癌に対する有効性が報告されている。一方、6-thioguanineは抗白血病剤として評価されてきたが、近年、固型癌にも有効性を示す可能性が示唆された。従って、本研究で得られた実験成績は、このACNUと6-thioguanineの併用療法は急性白血病に対してのみならず、種々の人癌に対してもその有効性が期待される事を強く示唆し、その意味で、本研究により6-thioguanineの臨床適応の拡大の可能性が明示され、既存薬剤の再評価の必要性が立証されたものと思われる。更に本研究により、ACNUと6-thioguanineの併用療法に於いて、従来の概念とは全く異質の相乗効果の発現機序が推察されたが、この特異な発現機序がありうるならば、抗癌剤および非抗癌剤を含めて、将来新しい薬剤を研究開発して行く上で一つの興味あるモデルを提供するものと期待される。

《本研究に用いた各種抗癌剤の構造式》

(1) アルキル化剤

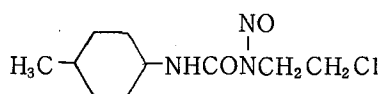
3-[(4-Amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)-methyl]-1-(2-chloroethyl)-1-nitroso-urea hydrochloride
(ACNU)



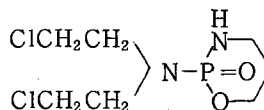
1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitroso-urea
(BCNU)



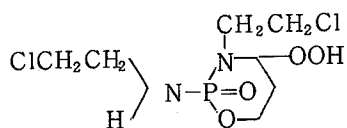
1-(2-Chloroethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitroso-urea
(Methyl-CCNU or Me-CCNU)



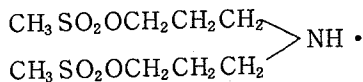
Cyclophosphamide
(Endoxan or EX)



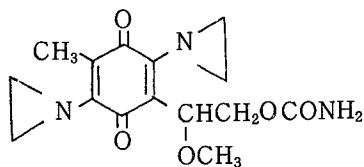
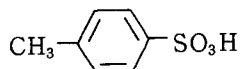
4-Hydroperoxyisophosphamide
(40497)



3,3'-Dimesyloxydipropylamine
tosylate
(864T)

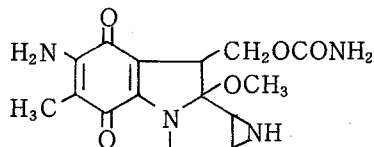


Carbazilquinone
(CO)

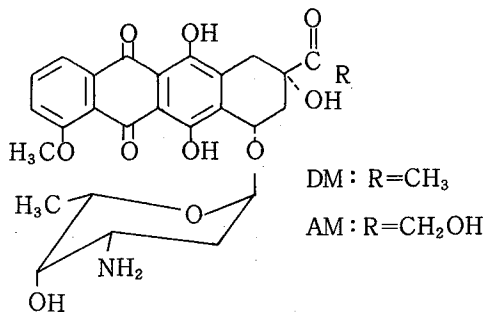


(2) 抗癌性抗生物質

Mitomycin C
(MMC)



Adriamycin and Daunomycin
(AM) (DM)



Neocarzinostatin
(NCS)

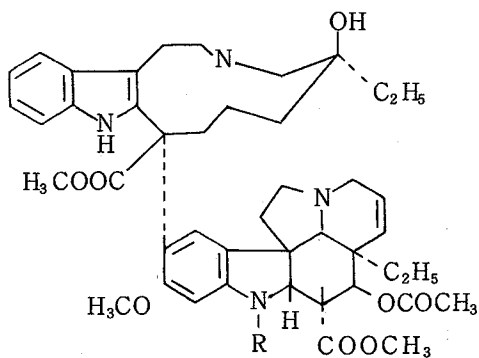
acidic protein, MW 10,708

(3) ビンカアルカロイド

Vincristine and Vinblastine
(VCR) (VLB)

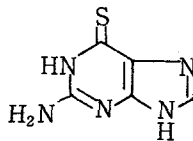
VCR: R=CHO

VLB: R=CH₃

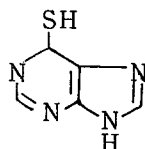


(4) 代謝拮抗剤

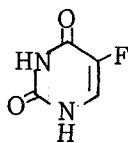
6-Thioguanine
(TG)



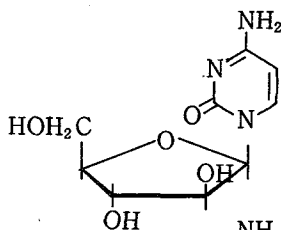
6-Mercaptopurine
(6-MP)



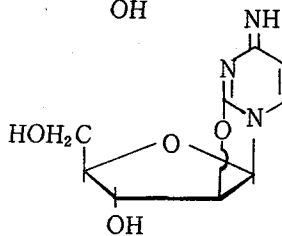
5-Fluorouracil
(5-FU)



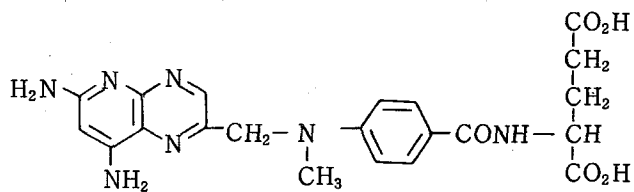
Cytosine arabinoside
(CA)



Cyclocytidine
(CC)



Methotrexate
(MTX)



審 査 結 果 の 要 旨

現在、癌治療薬としては数多くの化学療法剤があるが、それらの単独使用による効果は必ずしも満足出来るものではなく、より有効な使用法が検討されている。その一つとして作用機作の異なる抗癌剤を組合せて用いる、いわゆる多剤併用が検討され、実際、臨床的にも応用されている。

著者は白血病治療薬として評価されてきた6-チオグアニンを軸としての他剤との併用効果を詳細に追求した結果、6-チオグアニンとニトロソ尿素型の抗癌剤であるACNUとの併用が、白血病のみならず、他の固型癌に対して有効であることを見出し、またその相乗効果発現の機構を生化学的な追求によって明らかにした。

本実験においては、まず、チオグアニンと種々のアルキル化剤および抗癌性アルカロイド、抗生物質などとの2剤併用効果が、マウス白血病細胞を対象にして詳細に検討された。これらの実験結果から毒性面などを考慮するとACNUが併用剤として最も優れた作用を示すことが確認された。

次いでチオグアニンとACNUが併用条件を他の薬剤と比較しつつ検討し、また白血病以外のマウス肺癌並びにメラノーマに対する併用効果を追求した結果、この両者の併用はいづれの癌に対しても優れた効果を発揮することを認めた。

さらに、チオグアニンとACNU併用による相乗効果の機作を明らかにするため試験管内における殺細胞効果の機序を追求した結果、チオグアニンは単に核酸合成に必要な前駆物質の生合成を阻害するのみでなく、核酸中に組み込まれ、その構造変化を惹起することによりACNUの作用を増強させることを推定した。すなわち、チオグアニンはDNA鎖中のグアニンと入れ代り、ACNUの非酵素的分解により生じるクロルエチルカルボニウムイオンとDNAとのcross-linkingを容易にさせることによりチオグアニンとACNUとの相乗効果が発揮されるものと考えられた。

本研究の知見は新しい併用剤の発見に対し理論的根拠を与えると共に、現在、チオグアニンとACNUの併用効果は臨床的にも検討されつつある。以上の理由により、本論文は博士論文として充分評価し得るものとする。